

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590324

研究課題名（和文）低酸素誘導因子により転写誘導される細胞接着分子遺伝子群の協同作用の生理的意義

研究課題名（英文）Physiological significance of concerted action of cell adhesion molecules induced by hypoxia inducible factor

研究代表者

神奈木 玲児 (KANNAGI REIJI)

愛知医科大学・客員教授

研究者番号：80161389

研究成果の概要（和文）：低酸素によって同時に転写誘導される一連の細胞接着分子遺伝子の協同作用を解析した。またこれら以外に低酸素によって転写誘導されることがこれまで知られていなかった細胞接着分子があるかどうかについても検索した。その結果、低酸素によって糖脂質の糖部分と脂質部分に並行して変化が誘導され、糖蛋白質においても蛋白や糖側鎖に並行して変化が誘導され、これらの並行的変化が細胞の低酸素応答において互いに相乗的に機能することを示唆する成績が得られた。

研究成果の概要（英文）：We have explored what kind of changes in cell adhesion molecules are induced by cellular hypoxia, and have analyzed their cooperative interactions in cellular response to hypoxia. The results indicated that cellular hypoxia induces significant changes in both the glycan- and core lipid moieties within the glycolipid molecules simultaneously. The results indicated that hypoxia also induces simultaneous changes in both the glycan side chains and core protein moieties within the glycoprotein molecules. Our results suggested that these multiple changes appropriately cooperate in the physiological cellular response to cope with hypoxic environments in a synergistic manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：生体分子医学、低酸素誘導因子

1. 研究開始当初の背景

本研究を提案した当初、我々はすでに低酸素によって細胞接着分子に大きな変化が誘導されることを見だし、その分子生物学的背景をDNAマイクロアレイによって調査し

ていた。その結果、フィブロネクチンへの接着に関与する分子 $\alpha 5$ インテグリンとシンデカン4が低酸素により強く誘導されることや、低酸素によりフコース転移酵素、シアル酸転移酵素、UDP-ガラクトーストランスボ

ーター、シアル酸トランスポーターなどが強く誘導されることを見いだしていた。また、CD44 を介した細胞接着に関与する分子についても、その代謝に関連する遺伝子が低酸素によって大きく変動することを見いだしていた。低酸素によってこうした複数の細胞接着に関連する分子が誘導されることによって、細胞全体の機能に終局的にどのような変化をもたらされるかを、総合的に解明する必要性が感じられた。また、我々が当時までに見いだしていた変化以外にも、さらに低酸素で誘導される細胞接着関連遺伝子があるかどうかを精査する必要性を感じていた。

2. 研究の目的

細胞接着は多くの疾患の発症や病態生理に深く関連している。研究開始までの予備的な実験成績から、我々は低酸素によって複数の細胞接着分子に大きな変化が同時に誘導されることを見いだしたので、本研究では、複数の細胞接着関連遺伝子が低酸素によって同期して転写誘導されることによって細胞接着分子に相乗的な機能変化を起こすか否かを検索し、その相乗的な機能変化の背景にある接着分子関連遺伝子の転写調節機構を明らかにすることを研究目的とした。また、これまでに低酸素によって誘導されることが判明した細胞接着分子のほかに、さらに低酸素で誘導される細胞接着関連遺伝子があるかどうかを検索し、その機能的意義と相乗作用をもあわせ解明することを研究目的とした。

3. 研究の方法

我々は以前に、低酸素環境により細胞内の糖鎖合成遺伝子が数多く誘導され、これによって細胞表面の糖鎖が大きく変化することを明らかにした。今回は糖鎖を担う糖脂質分子の脂質部分にも、低酸素によって変化が起こるかどうかを解析した。細胞を低酸素状態で大量に培養してリン脂質と糖脂質を抽出し、その脂質部分の分子種を高速液体クロマトグラフィーと質量分析(HPLC-ESI-MS/MS法)によって解析した。また、低酸素状態で培養した細胞から RNA を抽出し、脂質部分の代謝に関わる一連の遺伝子の発現変化を RT-PCR 法によって解析した。

すでに予備実験の成績から、CD44 を介した細胞接着に関与する分子についても、その代謝に関連する複数の遺伝子が低酸素によって大きく変動することを見いだしていたので、この変動の詳細について引き続き詳細に解析した。とくに CD44 がその特異的糖鎖リガンドであるヒアルロン酸に結合すると同時に、CD44 分子それ自体のもつ糖側鎖が、セレクチンファミリーの細胞接着分子のリガンドとしても機能する点に着目して細胞

生物学的解析を進めた。

糖鎖を介した細胞接着によってケモカインを介したシグナル伝達が惹起されることが明らかになっている。低酸素によって変化する糖鎖の主な機能が細胞接着にあることが判明したので、この変化に並行してケモカインによるシグナル伝達側にも低酸素による変化が惹起されるかどうかを、主としてケモカインリセプターの遺伝子発現に焦点を合わせつつ検索した。

4. 研究成果

4-1: 低酸素による糖脂質の脂質部分の質量分析の結果、低酸素により糖脂質のセラミド分子種が変わり、正常なセラミドが減少し($p<0.01$)、その合成前駆体であるジヒドロセラミドが出現する($p<0.01$)ことが明らかになった。正常状態ではジヒドロセラミドは DES1 遺伝子産物の働きで正常なセラミドへとすみやかに合成される。この合成には酸素が必要であり、このため低酸素状態では合成が低下して前駆体であるジヒドロセラミドが蓄積すると考えられる。また、脂肪酸鎖部分においても、不飽和脂肪酸が減少して長鎖の飽和脂肪酸が有意に増加することが判明した。これは長鎖脂肪酸(VLCFA)中の不飽和脂肪酸と飽和脂肪酸のモル比の著明な変化($p<0.01$)として検出可能であった。不飽和脂肪酸鎖の合成にも酸素が必要とされることから、この変化は低酸素時の変化として妥当であると考えられた。

こうした変化はいずれも糖脂質の疎水性を大きく増大させ、これによって低酸素状態では細胞膜中での糖脂質の集合状態が変化し、糖鎖部分の変化と協同作用することによって、低酸素状態では細胞接着分子と糖脂質糖鎖との結合性が大きく変化すると考えられる。また、正常なセラミドは細胞のアポトーシスを惹起するとされるのに対し、ジヒドロセラミドはアポトーシス惹起作用が弱いと報じられているので、この変化は細胞の増殖状態に影響を与える可能性も考慮される。得られた結果の一部を報文として発表した。

これと並行して行った脂質部分の代謝に関わる一連の遺伝子の発現変化の RT-PCR 法による解析は、脂質部分の代謝に関わる酵素に分子状酸素を直接に利用するものが数多く見られ、低酸素によってこれらが変化する可能性が大きいと予想されたので、とくにこれらの酵素をコードする遺伝子に焦点を当てて解析した。その結果、興味深いことに、分子状酸素を基質とする酵素の遺伝子においても、低酸素により著明に転写が変化するものと、著明な変化を見ないものがあることが判明した。また、一部に解釈が困難な成績も得られ、脂質代謝に関与するこれら酵素遺伝子には、これまで文献上に報告されたもの

以外にも重要な遺伝子が存在することを示唆する結果も得られた。

低酸素で変化の見られた脂質部分の代謝系の一部は、糖脂質の脂質部分のみならず、リン脂質など他の複合脂質の代謝系とも連動していることから、今後はこれらも含めて低酸素による複合脂質の代謝変化を総合的に解明する必要があると感じられたので、その方向への予備的実験を開始した。低酸素で変化の見られた脂質部分の代謝系は、生体内では重要な生理活性脂質であるセラミドやスフィンゴシン1リン酸の産生と密接に関連しており、大きな生理学的意義を持つと考えられる。また、リン脂質の低酸素による代謝変化の予備的実験からは、プロスタグランジンなどのエイコサノイドやリゾホスファチジン酸などの重要な生理活性脂質の産生に関与するとみられる代謝系が、低酸素で著明に変化する事を示す成績がえられつつある。これらの生理活性脂質の一部は、現在も我々が研究を継続している糖鎖性の接着分子と同様に、細胞の運動能を亢進させて低酸素環境からの細胞の脱出に寄与するほか、血管内皮の誘導や血管形成にも関与するものが含まれており、低酸素環境に対する細胞反応応答として適切で合目的と考えられる。

4-2: 以前より解析を継続しているCD44を介した細胞接着については、今回は低酸素によって転写が変動する遺伝子数種を同定することが出来た。この成績に基づいて、その遺伝子に対するshRNA導入細胞を作成して、この変化の細胞生物学的意義を解析する段階へ前進した。

4-3: 低酸素による細胞接着糖鎖の発現誘導に並行して、ケモカインによるシグナル伝達系にも低酸素による変化が惹起されるかどうかについては、今回は特に初代培養の正常ケラチノサイトを用いて、ケモカインリセプター発現に対する低酸素環境の影響について検討を行った。とくにCCR7およびCXCR4について解析したところ、低酸素によってCXCR4遺伝子の転写が増大し、細胞表層での発現も増加することが判明した。他方、CCR7については大きな変化は観察されなかった。初代培養の正常ケラチノサイトのin vitroの分化系を用いた我々の細胞生物学的実験の結果では、CXCR4については低酸素による転写誘導が有意に観察されるのに対し、CCR7の転写は、低酸素よりもむしろ、細胞の分化度に規定されることを示唆する結果が得られた。

文献上は低酸素はCCR7もCXCR4もともに誘導するとされているので、今回の結果は既報と一部合致しない。今回の実験では扁平上皮細胞を用いており、この不一致は細胞種の相違による可能性がある。また、報文の多くは癌細胞についてのものであり、今回の実

験では非癌正常細胞を用いたことから、癌と正常細胞とでは誘導機序が異なっている可能性もある。いずれにせよ低酸素によるCCR7とCXCR4の転写誘導機序が必ずしも同一でないことを示す実験成績であり、今後検討する必要がある。得られた結果の一部を報文として発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計14件)

1. Miyazaki, K., Sakuma, K., Kawamura, Y. I., Izawa, M., Ohmori, K., Mitsuki, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Saito, Y., Dohi, T., and Kannagi, R.: Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors, siglec-7 and -9. *J. Immunol.*, **188**: 4690-4700, 2012. 査読有. 10.4049/jimmunol.1100605
2. Takematsu, H., Yamamoto, H., Naito-Matsui, Y., Fujinawa, R., Tanaka, K., Okuno, Y., Tanaka, Y., Kyogashima, M., Kannagi, R., and Kozutsumi, Y.: Quantitative transcriptomic profiling of branching in a glycosphingolipid biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.*, **286**: 27214-27224, 2011. 査読有. 10.1074/jbc.M111.234526
3. Kannagi, R., Ohmori, K., Chen, G. Y., Miyazaki, K., Izawa, M., and Sakuma, K.: Sialylated and sulfated carbohydrate ligands for selectins and siglecs: involvement in traffic and homing of human memory T and B lymphocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **705**: 549-569, 2011. 査読無. 10.1007/978-1-4419-7877-6_29
4. Radhakrishnan, P., Chachadi, V., Lin, M. F., Singh, R., Varki, A., Kannagi, R., and Cheng, P. W.: TNF α enhances the motility and invasiveness of prostatic cancer cells by stimulating the expression of selective glycosyl- and sulfotransferase genes involved in the synthesis of selectin ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **409**: 436-441, 2011. 査読有. 10.1016/j.bbrc.2011.05.019
5. Tanaka, K., Yamada, M., Tamiya-Koizumi, K., Kannagi, R., Aoyama, T., Hara, A., and Kyogashima, M.: Systematic analyses of free ceramide species and ceramide species comprising neutral glycosphingolipids by MALDI-TOF MS with high-energy CID. *Glycoconj. J.*, **28**: 67-87, 2011. 査読有. 10.1007/s10719-011-9325-6
6. Yusa, A., Miyazaki, K., Kimura, N., Izawa, M., and Kannagi, R.: Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene DTDST induces

- sialyl Lewis^X expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res.*, **70**: 4064-4073, 2010. 査読有 . 10.1158/0008-5472.CAN-09-2383
7. Ueda, M., Shimada, T., Goto, Y., Tei, K., Nakai, S., Hisa, Y., and Kannagi, R.: Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, **37**: 488-495, 2010. 査読有 . 10.1016/j.anl.2009.11.012
 8. Kannagi, R., Sakuma, K., Miyazaki, K., Lim, K-T., Yusa, A., Yin, J., and Izawa, M.: Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: Clues in the ongoing search for new tumor markers. *Cancer Sci.*, **101**: 586-593, 2010. 査読有 . 10.1111/j.1349-7006.2009.01455.x
 9. Igarashi, Y. and Kannagi, R.: Glycosphingolipids as mediators of phenotypic changes associated with development and cancer progression. *J. Biochem.*, **147**: 3-8, 2010. 査読有 . 10.1093/jb/mvp195
 10. Zhang, X., Nakajima, T., Kamijo, Y., Li, G., Hu, R., Kannagi, R., Kyogashima, M., Aoyama, T., and Hara, A.: Acute kidney injury induced by protein-overload nephropathy down-regulates gene expression of hepatic cerebroside sulfotransferase in mice, resulting in reduction of liver and serum sulfatides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**: 1382-1388, 2009. 査読有 . 10.1016/j.bbrc.2009.10.164
 11. Yang, Z., Wu, J. H., Kuo, H. W., Kannagi, R., and Wu, A. M.: Expression of sialyl Le^X, sialyl Le^a, Le^X and Le^Y glycotopes in secreted human ovarian cyst glycoproteins. *Biochimie*, **91**: 423-433, 2009. 査読有 . 10.1016/j.biochi.2008.11.002
 12. Ebisuno, T., Katagiri, K., Katakai, T., Ueda, Y., Nemoto, T., Inada, H., Nabekura, J., Okada, T., Kannagi, R., Tanaka, T., Miyasaka, M., Hogg, N., and Kinashi, T.: Rap1 controls lymphocyte adhesion cascades and interstitial migration within lymph nodes in a RAPL-dependent and independent manner. *Blood*, **115**: 804-814, 2009. 査読有 . 10.1182/blood-2009-03-211979
 13. Yin, J., Miyazaki, K., Shaner, R. L., Merrill, A. H. Jr., and Kannagi, R.: Altered sphingolipid metabolism induced by tumor hypoxia - new vistas of glycolipid tumor markers. *FEBS Lett.*, **584**: 1872-1878, 2009. 査読有 . 10.1016/j.febslet.2009.11.019
 14. Kannagi, R., Ohmori, K., and Kimura, N.: Anti-oligosaccharide antibodies as tools for studying sulfated sialoglycoconjugate ligands for siglecs and selectins. *Glycoconj. J.*, **26**: 923-928, 2009. 査読有 . 10.1007/s10719-008-9122-z
- [学会発表] (計 8 件)
1. Kannagi R., Biology of Sugar Modification. [Chairman overview] The 3rd Workshop of the Netherlands-Japan on Recent Advances in Glycobiology, October 8-11, 2011, Nagoya, Japan, Program and Abstract, pp. 17-18, 2011.
 2. Kannagi R.: Role of glycan ligands for selectins and siglecs in cancer progression and metastasis. [Invited Speaker], International Symposium on Inflammation and Disease, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Sept. 8-9, 2011, Program and Abstracts, pp. 11, 2011.
 3. 神奈木玲児: 最近の腫瘍マーカー糖鎖研究の展望. 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会特別講演, 名古屋, 10月2日, 2011, 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会抄録集, pp. 22-23, 2011.
 4. Kannagi R.: Cell surface glycoconjugates involved in human lymphocytes homing of bronchial asthma and atopic dermatitis patients. [Invited Speaker] "The Uehara Memorial Foundation Symposium-2011, Chembiomolecular Science: at the Frontier of Chemistry and Biology" Hyatt Regency, Tokyo, Japan, June 6-8, 2011, Program & Abstracts, pp. 66, 2011.
 5. 神奈木玲児, 糖鎖と腫瘍マーカー. 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月22-24日, 大阪国際会議場(大阪市), 第69回日本癌学会総会記事, pp. 226, 2010.
 6. Kannagi R.: Sulfated carbohydrate ligands for selectins and siglecs. [Invited Speaker] The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation, Shonan Village Center, Kanagawa, Japan, July 27-30, 2010. Program and Abstracts, pp. 17-18, 2010.
 7. Kannagi R., Sakuma K., Miyazaki K, Kimura N, Ohmori K: Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in pathogenic homing behaviors of T- and B-lymphocytes. [Invited Speaker] 20th International Symposium on Glycoconjugates, San Juan, Puerto Rico, Nov. 29-Dec. 4, 2009. *Glycoconj. J.*, **26**: 861, 2009, 2009,
 8. 神奈木玲児, 糖鎖修飾と細胞認識. 第3回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム, 5月23日, 2009, 名古屋市立大学医学部(名古屋市)日本生化学会中部支部例会・

シンポジウム プログラム・抄録集, pp. S3,
2009,

[図書] (計 4 件)

1. 神奈木玲児: 糖鎖抗原と腫瘍. “臨床検査ガイド 2011-2012” 文光堂, 東京, pp. 875-880, 2011. 総ページ数 1082.
2. Varki, A., Kannagi, R., and Toole, B. P. Glycosylation changes in cancer. コールドスプリングハーバー糖鎖生物学第2版, 丸善株式会社, 東京, pp. 523-535, 2010. 総ページ数 651.
3. 神奈木玲児: がん細胞に特有な糖鎖とのはたらき. “糖鎖を知る—その素顔と病気への挑戦” 科学技術振興機構, 東京, pp. 88-97, 2010. 総ページ数 244.
4. 神奈木玲児: がんの進展における糖鎖のはたらき. “第3の生命鎖、糖鎖の謎が今、解る” クバプロ社, 東京, pp. 63-71, 2009. 総ページ数 248.

[その他]

ホームページ

<http://www.aichi-med-u.ac.jp/institute/outline/sentanigaku.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神奈木 玲児 (KANNAGI REIJI)

愛知医科大学・客員教授

研究者番号: 80161389

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐久間 圭一郎 (SAKUMA KEIICHIRO)

愛知県がんセンター (研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号: 90402891

後藤 嘉子 (GOTO YOSHIKO)

愛知県がんセンター (研究所)・分子病態学部・主任技師

研究者番号: 30416169